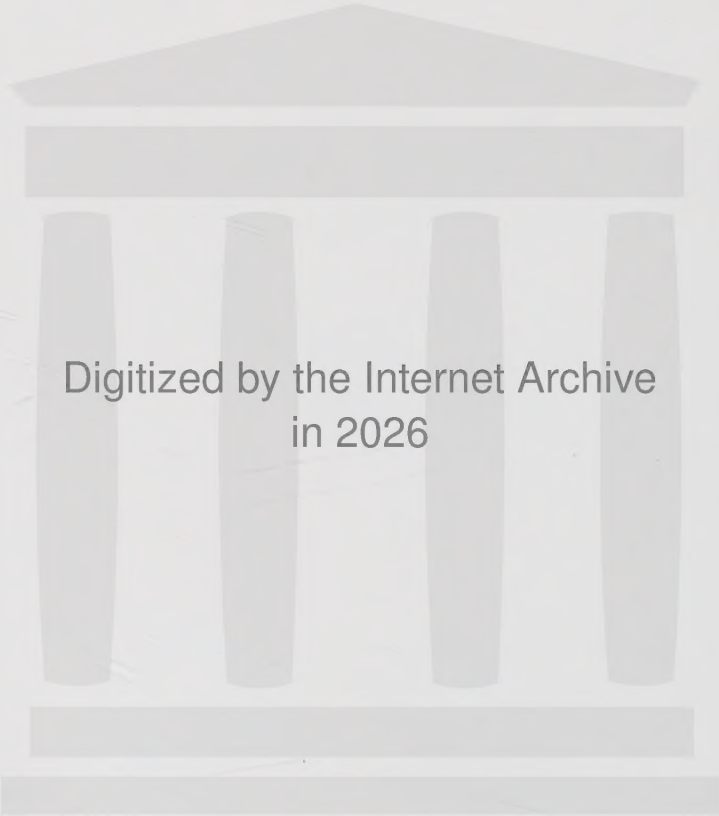


UNTERSUCHUNGEN ZUR
IN - VITRO - ZYTOSTATIKA - RESISTENZTESTUNG
BEI GYNÄKOLOGISCHEN MALIGNOMEN

HEDIATY UTARI - WITT

1985

Diss München



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554620_0009

Aus der Frauenklinik der Universität München

im Klinikum Großhadern

Direktor: Prof.Dr.H. Hepp

Untersuchungen zur in-vitro-Zytostatika-
Resistenztestung bei gynäkologischen Malignomen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Hediaty Utari-Witt

aus

Surabaya/Indonesien

1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. W. Eiermann
Mithberichterstatter: Prof. Dr. H. Hepp
Dekan: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 25.4.1985

MEINEN ELTERN GEWIDMET

INHALTSVERZEICHNIS

I. EINFÜHRUNG

- I. 1. ZYTOSTATIKA
- I. 2. DIE GEWEBEKULTUR
DIE ORGANKULTUR
- I. 3. DIE IN-VITRO-"SENSIBILITÄTSTESTUNG" VON
ZYTOSTATIKA MIT RADIOAKTIVEN NUCLEINSÄURE-
PRÄKUSOREN (VOLM)
- I. 4. ENTWICKKLUNG DER VOLM-METHODE
- I. 5. NU-NU-MÄUSE ALS IN-VIVO-MODELL
- I. 6. AUFGABENSTELLUNG IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

II. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODIK

II. 1. PATIENTEN

- II. 1.1. PATIENTENGRUPPIERUNG, ALTER UND STADIENEINTEILUNG
- II. 1.2. OPERATIONEN
- II. 1.3. ZYTOSTATISCHE BEHANDLUNG
- II. 1.4. STRAHLENTHERAPIE
- II. 1.5. HORMONBEHANDLUNG
- II. 1.6. NACHUNTERSUCHUNGEN
- II. 1.7. ÜBERLEBENSZEIT

II. 2. MATERIALIEN

- II. 2.1. PRÄPARATE
- II. 2.2. NÄHRMEDIEN
- II. 2.3. ZYTOSTATIKA, IHRE KONZENTRATION UND RADIOAKTIV
MARKIERTE VORLÄUFER
- II. 2.4. RADIOAKTIVE SUBSTANZEN
- II. 2.5. SONSTIGES

II. 3. METHODIK

- II. 3.1. AUSFÜHRUNG
- II. 3.2. KONTROLLEN

III. ERGEBNISSE

III. 1. ERGEBNISSE BEI OVARIALKARZINOM

III. 1.1. GEWINNUNG DER ZELLSUSPENSION

III. 1.2. ZYTOLOGIE

III. 1.3. EINBAURATE (Cpm) RADIOAKTIVER PRÄKUSOREN

III. 1.4. KINETIK

III. 1.5. HEMMUNG BZW. ABFALL DER EINBAURATE NACH ZYTOSTATIKA-GABE BEI IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG"

III. 2. ERGEBNISSE BEI MAMMAKARZINOM

III. 2.1. GEWINNUNG DER ZELLSUSPENSION

III. 2.2. ZYTOLOGIE

III. 2.3. EINBAURATE (Cpm) RADIOAKTIVER PRÄKUSOREN

III. 2.4. KINETIK

III. 2.5. HEMMUNG BZW. ABFALL DER EINBAURATE NACH ZYTOSTATIKA-GABE BEI IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG"

III. 3. ERGEBNISSE BEI CORPUS- (ENDOMETRIUM-) KARZINOM

III. 3.1. GEWINNUNG DER ZELLSUSPENSION

III. 3.2. ZYTOLOGIE

III. 3.3. EINBAURATE (Cpm) RADIOAKTIVER PRÄKUSOREN

III. 3.4. KINETIK

III. 3.5. HEMMUNG BZW. ABFALL DER EINBAURATE NACH ZYTOSTATIKA-GABE BEI IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG"

III. 4. ZUR KORRELATION ZWISCHEN IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG" UND KLINISCHEM VERLAUF

III. 4.1. MIT ZYTOSTATIKA BEHANDELTE PATIENTINNEN

III. 4.2. KLINISCHE DURCHFÜHRUNG DER ZYTOSTATIKA-BEHANDLUNG

III. 4.3. KORRELATION ZWISCHEN IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG" UND DEM KLINISCHEN VERLAUF

IV. DISKUSSION

IV. 1. REPRODUZIERBARKEIT DER VOLM-METHODE

IV. 2. DIE BEDEUTUNG DER IN-VITRO-"RESISTENZTESTUNG" ALS PRÄTHERAPEUTISCHE UNTERSUCHUNGSMETHODE

IV. 2.1. LITERATURVERGLEICH

IV. 3. DIE PROBLEMATIK DER METHODE

IV. 3.1. DIE PROBLEMATIK AUS MOLEKULARBIOLOGISCHER SICHT

IV. 3.2. DIE PROBLEMATIK DER GRENZZIEHUNG ZWISCHEN "SENSIBEL" UND RESISTENT

IV. 3.3. EINFLÜSSE AUF DIE ÜBERLEBENSZEIT

V. ZUSAMMENFASSUNG

VI. DANKSAGUNG

VII. LITERATURVERZEICHNIS

I. EINFÜHRUNG

I. 1. ZYTOSTATIKA

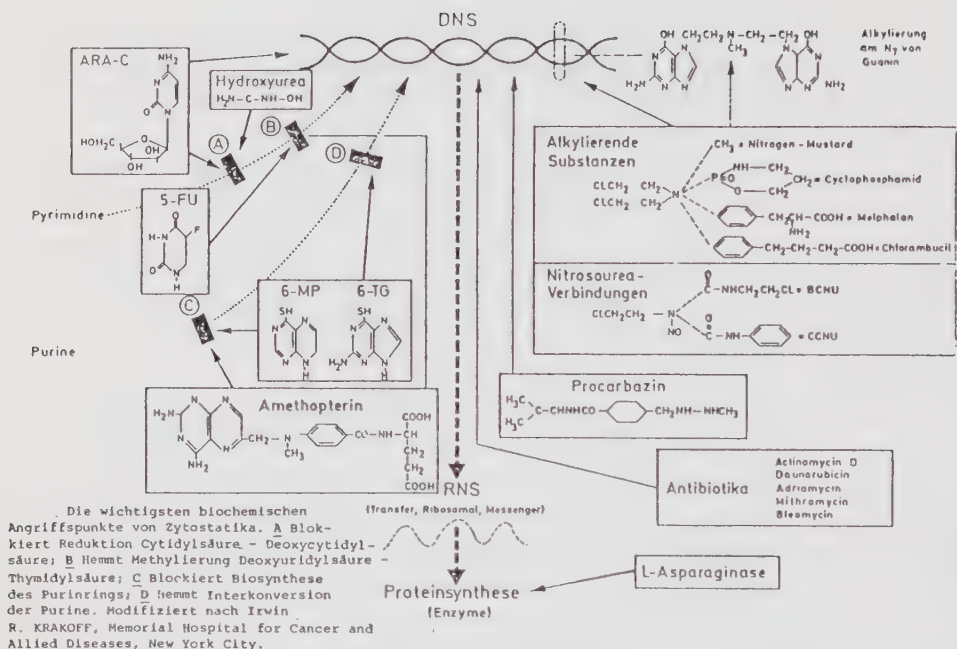
Die ersten Ansätze einer gezielten Chemotherapie maligner Tumoren mit zytostatisch wirksamen Substanzen begannen 1946 mit der Einführung des Urethan in die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (WILMS, 1975) und des Stickstoff-Lost in die Therapie der Lymphogranulomatose und anderer maligner Lymphknotenerkrankungen.

1947 zeigte FARBER, W., daß durch den Folsäureantagonisten Aminopterin Remissionen bei akuten Leukosen induziert werden können.

In den vergangenen Jahren wurde eine Vielzahl zytostatisch wirksamer Substanzen aus ganz heterogenen Stoffklassen im Laboratorium synthetisiert oder aus biologischem Material isoliert und in die Klinik eingeführt. Das Idealziel der zytostatischen Therapie besteht in einer isolierten Zerstörung der malignen Zellpopulation ohne Schädigung des Organismus. Von diesem Ziel ist man aber noch weit entfernt. Alle Zytostatika wirken über den Eingriff in den Zellstoffwechsel; die meisten blockieren Stoffwechselwege, die für das Zellwachstum und die Zellteilung erforderlich sind.

Da bis heute keine besondere Stoffwechseleigenschaft der malignen Zelle bekannt ist, die für das maligne Wachstum charakteristisch ist und sich spezifisch von denen normaler, proliferierender Zellen unterscheidet, gelingt es auch nicht, nur die maligne Zellpopulation isoliert zu schädigen.

Das Schema von BRUNNER, K.W. und NAGEL, G.A. (1979) soll einen Überblick über die zahlreichen Zytostatika und deren verschiedene Angriffspunkte geben.



Aus oben angeführten Gründen muß man bei einer intensiven zytostatischen Therapie neben der erwünschten Proliferationshemmung für die maligne Zellpopulation auch mit einer Schädigung der normal proliferierenden Gewebe rechnen. Diese betrifft insbesondere Organe mit raschem Zellumsatz: Das Knochenmark, die Mund- und Darmschleimhaut, die Gonaden und das Haarbett (SCHMÄHL, D. 1963), dementsprechend sind die wichtigsten unerwünschten Wirkungen. Außerdem kommen noch eine ganze Reihe anderer klinischer Erscheinungen wie Inappetenz, Nausea, Fieber, Pneumopathien, Kardiotoxizität als Spätfolge hinzu (BRUNNER, K.W. und NAGEL, G.A. 1979).

I. 2. DIE GEWEBEKULTUR

Man weiß schon länger, daß der Erfolg einer zytostatischen Behandlung bei Karzinomen unterschiedlich ausfällt. Deshalb wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen Testverfahren entwickelt, um prätherapeutisch die Sensibilität bzw. Resistenz maligner Tumoren auf bestimmte Zytostatika zu erfassen.

Die älteste und am häufigsten verwandte Methode ist die Gewebekultur. Dabei wird durch Operation oder Biopsie gewonnenes Tumorgewebe in einem Nährmedium gezüchtet und nach Auswachsen der Zellen werden dann verschiedene Zytostatika einzeln in mehreren Konzentrationen hinzugesetzt. Zytostatika, die bereits in der geringsten Konzentration starke morphologische Veränderungen hervorrufen, werden als die wirksamsten angesehen (LIMBURG, H.; KRAHE, M., 1962).

TÖPLIN, J. et al., 1959 und COBB, J.P., WALKER, D.G., WRIGHT, J.C., 1961, benutzten Vakuolisierung, Pyknose, Karyorhexis und mangelnde Färbbarkeit als morphologische Kriterien.

Diese Kriterien zur Auswertung der zytostatischen Wirksamkeit erfuhren im Laufe der Zeit einige Modifikationen. DI PAOLO, J.A. (1963) und Mitarbeiter benutzten die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität als Parameter für die zytostatische Wirksamkeit; STÄHELIN, H. (1962) und die Arbeitsgruppe KRAFFT, W., PREIBISCH, W., MARZOTKO, F. und NIEDNER, K. die Bestimmung der Zellzahl vor und nach zytostatischer Gabe (1974); EAGLE, H., FOLEY, G.E. (1958) und später KUPIECKI, F.P. (1965) die quantitative Proteinbestimmung; TOPLIN, J. (1961), SCHELLENBERG, H. und DOMENJOZ, R. (1962) die pH-Änderung des Kulturmediums.

DIE ORGANKULTUR

Eine andere, der Gewebekultur ähnliche Methode, ist die Organkultur. Sie unterscheidet sich von der Gewebekultur

dadurch, daß nicht nur epitheliale Zellen auswachsen, sondern daß auch alle mesenchymalen Elemente in das Wachstum miteinbezogen werden. Diese Kultivierung ist aber sehr aufwendig und schon deshalb für Routineuntersuchungen nicht geeignet (WÜST, G.P., 1973).

I. 3. DIE IN-VITRO-"SENSIBILITÄTSTESTUNG" VON ZYTOSTATIKA MIT RADIOAKTIVEN NUKLEINSÄUREPRÄKUSOREN (VOLM)

In den letzten Jahren wurde eine einfache Methode beschrieben, bei der eine Zellsuspension von Tumoren gewonnen und der Einbau radioaktiver Nukleinsäurepräkusoren in Zellen, ohne und bei Gabe von Zytostatika, bestimmt wird.

Die Arbeitsgruppe von VOLM, M., KAUFMANN, M., HINDERER, H. und GOERTILLER, K., gehört zu den Pionieren dieser Methode. In ihrer Arbeit (1969) fanden sie einen bemerkenswerten Zusammenhang zwischen der Einbaurate und der dazu benötigten Zeit (Kinetik), ohne und bei Gabe eines Hemmstoffes (Hydroxyharnstoff).

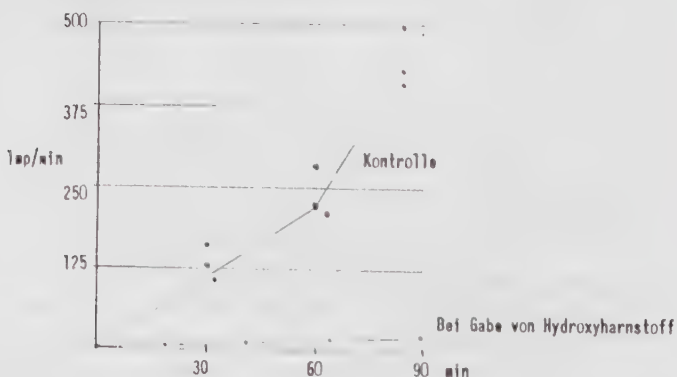


Abb. 1

Folgerung: Während der ^3H -Thymidin-Einbau in den Kontroll-schnitten in der Zeiteinheit linear zunimmt, ist die DNS-Synthese nach Gabe von Hydroxyharnstoff über die gesamte Versuchszeit-spanne blockiert.

Bei gleicher Versuchsanordnung unter Verwendung von Zytostatika, deren Angriffspunkt an der RNS- bzw. Protein-Synthese ist, kann radioaktiv markiertes Uridin oder Leucin angewendet werden um zytostatische Effekte zu registrieren (VOLM und Mitarbeiter, 1969).

Das Schema von BRUNNER, K.W. und NAGEL, G.A. (1979) veranschaulicht Angriffspunkte einiger Zytostatika und die dazu benötigten radioaktiven Nukleinpräkusoren (siehe Seite 2).

I. 4. ENTWICKLUNG DER VOLM-METHODE

MATTERN, J., KAUFMANN, M., VOLM, M. und Mitarbeiter (1972) stellten mit Hilfe der oben beschriebenen Methode bei 30 menschlichen Adenokarzinomen fest, daß Tumoren trotz ähnlicher Histologie auf ein bestimmtes Zytostatikum unterschiedlich reagierten. Deshalb sprachen sie für eine individuelle Gestaltung der Chemotherapie bei Karzinomen.

In einer weiteren Arbeit (1974) (VOLM, M., KAUFMANN, M., WAYSS, K. und MATTERN, J.) fanden sie, daß eine deutliche Beziehung zwischen der Uridin-Einbaurate und der zytostatischen Wirkung auf die Karzinomzellen in der In-vitro-"Sensibilitätstestung" bestand. Je höher der Einbau bei Kontrollwerten war, um so größer war auch die Hemmwirkung durch das Zytostatikum.

Eine gute Korrelation zwischen der hohen zytostatischen Wirksamkeit in der In-vitro-"Sensibilisierungstestung" und einem entsprechend günstigeren Krankheitsverlauf mit Verlängerung der Überlebensraten der Patientinnen wurde bei Ovarialkarzinomen festgestellt (KAUFMANN, M., MATTERN, J., WAYSS, K. und VOLM, M., 1975). Solche Korrelationen wurden bereits beim Aufstellen von Onkobiogrammen - erzielt durch die Gewebekultur - und dem klinischen Therapieerfolg bei Ovarialkarzinomen von LIMBURG und HECKMANN (1969) und KRAFT et al. (1973) gefunden.

Zweifellos ist die oben beschriebene Methode für die Routineuntersuchung vielversprechend und ist deshalb optimistisch beurteilt worden. Weitere Ergebnisse, deren Aussagen aber

nicht mehr so eindeutig zuzuordnen sind, mahnen jedoch zur Vorsicht. Sachlicher, wenn auch nicht mehr so enthusiastisch war die Aussage der Arbeitsgruppe MATTERN, J., KAUFMANN, M., WAYSS, K. und VOLM, M. (1976): Eine klinisch beurteilbare Sensibilität gegenüber einer Behandlung mit Adriamycin läßt sich nur bei Tumoren mit Uridineinbauhemmung in der In-vitro-"Sensibilisierungstestung" von mehr als 40% feststellen. Allerdings handelt es sich hier - im Gegensatz zu ihrer vorherigen Untersuchung nicht um Ovarialkarzinome, sondern - um Lungentumoren.

BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H., GERNER, R., MICHEL, R.T., NORO, D. und LEPIEN, G. (1975) zeigten, daß aus 137 Mammakarzinomen 125 Testungen ausgewertet werden konnten; davon waren nur 30% auf zytostatische Behandlung sensibel, allerdings meist gleichzeitig gegen mehrere Zytostatika. Unter einigen Korrelationen, die sie herausgefunden haben (zwischen dem histologischen Typus, bzw. Proliferationsaktivität und der Sensibilität der Mammakarzinome im In-vitro-Test), war die zwischen klinischen Ergebnissen und der Sensibilität der Karzinomzellen im In-vitro-Test nicht zu finden.

POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und ERHART, H. (1976) gingen eindeutig von einer "negativen Aussage" aus, nämlich, daß die oben beschriebene Methode mit hoher Sicherheit diejenigen Zytostatika aufzeigen kann, die gegenüber dem untersuchten Tumor wirkungslos sind. Diese Feststellung fußt besonders auf der Überprüfung einer Patientengruppe, die entsprechend der Tumorresistenztestung behandelt wird. Aus den klinischen Therapieprogrammen wurden diejenigen Zytostatika eliminiert, die sich in der In-vitro-"Resistenztestung" als resistent erwiesen hatten: In keinem Fall dieser Gruppe war es nach einem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen zu einer Progression des Tumorwachstums gekommen. Somit können Patienten durch prätherapeutische Kenntnis solcher Substanzen vor überflüssiger und zusätzlich schädigender Wirkung der Zytostatika bewahrt werden.

I. 5. NU-NU-MÄUSE ALS MODELL

Ein interessantes Modell zum Studium der prätherapeutischen Sensibilitätstestung ist die Transplantation von Tumorgewebe auf sogenannte Nu-Nu-Mäuse.

Hierbei kann man einerseits Ovarialkarzinomgewebe oder Mammakarzinomgewebe auf diese Tiere transplantieren um die Ansprechbarkeit der Zytostatika-Behandlung zu überprüfen. Ein Grund, warum diese Methode noch keinen großen Anklang gefunden hat, ist die geringe Anwachsrate (10-30%) (MICHEL, Th. und Mitarbeiter, 1980).

I. 6. AUFGABENSTELLUNG IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT

Versucht man nun sich aus den bisher erwähnten Aussagen verschiedener Autoren einen Überblick zu verschaffen und sich mit ihren Ergebnissen, die zum Teil recht schwierig zu interpretieren sind, auseinanderzusetzen, so ergeben sich folgende Fragestellungen:

1. Sind die bisherigen Ergebnisse (VOLM-Methode) am eigenen Material reproduzierbar?
2. Gibt es eine Korrelation zwischen dem Ergebnis der "In-vitro-Resistenztestung" der Karzinomzellen und dem klinischen Therapieergebnis?

Außerdem liegt es nahe

3. die methodischen Probleme aufzuzeigen.

Diese Fragen sollen bei folgenden gynäkologischen Karzinomen untersucht werden:

1. Ovarialkarzinom
2. Corpus-(Endometrium)Karzinom
3. Mammakarzinom

II. PATIENTEN, MATERIALIEN UND METHODIK

II. 1. PATIENTEN

II. 1.1. Patientengruppierung, Alter und Stadieneinteilung

Insgesamt waren es 35 Patientinnen, die in diese Untersuchung einbezogen wurden.

Davon waren:

- 13 Patientinnen an Ovarialkarzinom erkrankt, die Älteste war 84 Jahre, die Jüngste 45 Jahre alt. Die Einteilung nach dem intraoperativen Befund am Operationspräparat ergab in 3 Fällen Stadium Ic, in 2 Fällen Stadium II, in 3 weiteren Fällen Stadium III und in 5 Fällen Stadium IV.
- 12 Patientinnen an Mammakarzinom erkrankt, die Älteste war 76, die Jüngste 45 Jahre alt. In der Stadieneinteilung nach TNM-System gehörten 3 zu dem Stadium $T_1 - N_1 - M_0$, 3 zu $T_2 N_1 M_0$, 2 zu $T_3 N_2 M_0$ und die restlichen 4 Fälle zeigten bereits Fernmetastasen.
- 10 Patientinnen an Corpus(Endometrium)-Karzinom erkrankt, die Älteste war 83, die Jüngste 53 Jahre alt. In 2 Fällen war eindeutig, daß noch keine Infiltration stattgefunden hatte - entsprach also dem Stadium Ia/Ib nach Figo, - in den anderen Fällen ließ sich nach dieser Stadieneinteilung nicht immer eindeutig klassifizieren.

II. 1.2. Operationen

Keine Patientin der Ovarialkarzinomgruppe wurde vorher therapiert. Bei allen Patientinnen wurde eine Laparotomie durchgeführt, wobei der Uterus unter Mitnahme beider Adnexe exstirpiert wurde. Bei drei Patientinnen war Aszitespunktion notwendig; bei einer Patientin bildeten sich häufig Pleuraergüsse, so daß eine Pleurapunktion zur Erleichterung der Atembeschwerden zusätzlich vorgenommen werden mußte.

Bei der 2. Patientengruppe mit Mammakarzinom wurde in 7 Fällen eine erweiterte Mastektomie nach Schnellschnitt-diagnostik durchgeführt, in 4 Fällen eine einfache Mastektomie. Bei einer Patientin wurde ein Lokalrezidiv operiert, wobei gleichzeitig noch eine pulmonale Metastase vorlag.

Bei der Korpuskarzinomgruppe wurde in 8 Fällen eine Laparotomie mit Exstirpation von Uterus und beider Adnexe durchgeführt. Bei 2 Fällen handelte es sich um ein Rezidiv; das Gewebe wurde vom Scheidenblindsack gewonnen.

II. 1.3. Zytostatische Behandlung

Mit Ausnahme von 4 Fällen wurde bei allen Patientinnen, die an Ovarialkarzinom erkrankt waren, eine zytostatische Behandlung durchgeführt. In erster Linie wegen des schlechten Allgemeinzustandes und Alters der Patientinnen wurden bei den obengenannten Ausnahmefällen keine Zytostatika verabreicht.

Hingegen wurden 2 Patientinnen mit Mammakarzinom nach der Primärtherapie mit Zytostatika behandelt, da Fernmetastasen vorlagen.

Bei fortgeschrittenen Korpus(Endometrium)-Karzinomen wurde in 2 Fällen eine Zytostatika-Behandlung durchgeführt; es sind Fälle, wo letztendlich der Ausgangspunkt des Karzinoms nicht eindeutig feststellbar war und Tumorausbreitung festgestellt wurde.

Von 35 Fällen sind also insgesamt 14, wo Zytostatika postoperativ verabreicht wurden.

II. 1.4. Strahlentherapie

Die Art der Strahlentherapie variierte.

Ovarialkarzinom

Aufgrund schlechten Allgemeinzustandes wurden 2 Patientinnen bestrahlt. Bei einer Patientin wurde eine Strahlenbehandlung als notwendig befunden, als sich der Allgemeinzustand während einer Zytostatika-Stoßtherapie zunehmend verschlechterte.

Mammakarzinom

10 von 12 Patientinnen wurden postoperativ nachbestrahlt.

Corpus(Endometrium)-Karzinom

Eine kombinierte Strahlentherapie (Radiumeinlage und Gammatron) wurde postoperativ bei 8 Patientinnen durchgeführt.

II. 1.5. Hormonbehandlung

Bei Corpus(Endometrium)-Karzinom wurde eine hochdosierte Gestagentherapie regelmäßig postoperativ gegeben. So erhielten 9 von 10 Patientinnen Medroxyprogesteronacetat (MPA); bei einer Patientin war aufgrund nicht eindeutigen histologischen Befundes (Primärtumor nicht erkannt) keine MPA-Therapie durchgeführt worden.

II. 1.6. Nachuntersuchungen

Der klinische Verlauf wird einzeln bis zum jetzigen Zeitpunkt (November 1980) verfolgt.

In den meisten Fällen waren die Nachuntersuchungen weitgehend vollständig erfolgt. Bei 4 Patientinnen mit

Ovarialkarzinom waren die Unterlagen unvollständig, jedoch ausreichend für die Beantwortung der in dieser Arbeit vorgelegten Fragestellung und der Überlebenszeit.

II. 1.7. Überlebenszeit

Die Überlebenszeit der Patientinnen wurde vom Tag der Operation an gerechnet.

II. 2. MATERIALIEN

II. 2.1. Präparate

Von insgesamt 35 Experimenten hat man Präparate aus verschiedenen Materialien gewonnen.

- | | |
|--------------------------|---------------------|
| - 33 solide Op-Präparate | 10 Ovarialkarzinome |
| | 12 Mammarkarzinome |
| | 10 Corpuskarzinome |

Bei nekrotischen oder stark hämorrhagischen Präparaten wurde das Experiment eingestellt; alle Präparate waren makroskopisch frisch und dadurch relativ leicht zu verarbeiten.

- 2 Ascitespunktat
- 1 Pleurapunktat

II. 2.2. Nährmedien

Hanks-Lösung

Stamm-Lösung A:	NaCl	80,00 g	
	KCl	4,00 g	
	CaCl ₂	1,40 g	1000 ml
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,00 g	
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,00 g	
Stamm-Lösung B:	Dextrose	10,00 g	
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,20 g	1000 ml
	KH ₂ PO ₄	0,60 g	
	NaHCO ₃	3,50 g	

100 ml Lösung A + 100 ml Lösung B ad 1000 ml
aqua dest = gebrauchsfertige Hanks-Lösung.

Aufbewahrung: Im Kühlschrank bei + 4°C.

Verwendung im Experiment:

- Bei dem sofortigen Transport vom Op-Raum ins Labor unter sterilen Bedingungen.
- Als vorläufige Nährlösung bei anschließender mechanischer Zellsuspensionsgewinnung.

TCM 199 (Difco)

11 g TC Medium 199, dried (Code 5701-24) + 0,35 g
NaHCO₃ ad 1000 ml = TCM 199.

Aufbewahrung: In Portionen von je 50 ml eingefroren
und bei -24°C.

Verwendung im Experiment:

- Als Nährlösung für die gewonnene Zellsuspension im gesamten Experiment.
- Als Lösungsmittel für die Zytostatika.

II. 2.3. Zytostatika, ihre Konzentrationen und radioaktiv markierte Vorläufer

	Konz. 100 (mg/ml)	radioaktiv markierte Vorläufer
4-Hydroperoxycyclophosphamid	10^{-1}	^3H -Thymidin
Methotrexat	10^{-2}	^3H -Desoxyuridin
5-Fluoruracil	10^{-1}	^3H -Desoxyuridin
Adriamycin	10^{-1}	^3H -Uridin

Eine kurze Erläuterung über die radioaktiv markierten Vorläufer wurde in der Einführung gebracht.

Siehe auch das Schema von BRUNNER, K.W. und NAGEL, G.A. (1979).

Konzentrationen

Aus der Tabelle ist die angestrebte Konzentration der Zytostatika pro ml Zellsuspension ersichtlich. - Sie entspricht der 100-fachen therapeutischen Menge. (VOLM)

II. 2.3. Zytostatika

Adri.blastin^R: Endkonzentration = 10^{-1} mg/ml
Zellsuspension.
Substanz = 2 mg Adri.blastin +
10 mg Trägersubstanz.

Aus der Stammlösung wurden 50 µl
entnommen und ins Versuchsröhrchen
pipettiert.

Ausführung folglich:

1 mg Adri.blastin (+ 5 mg Trägersubstanz)
6 mg aus der Substanz einwiegen, in
0,5 ml TCM lösen.

Methotrexat: Endkonzentration = 10^{-2} mg/ml Zell-
suspension.
Substanz = 0,2 mg Methotrexat +
0,02 Trägersubstanz.

Nach analoger Berechnung ergibt sich =
1,1 mg Substanz in 5 ml TCM lösen.

5-Fluorouracil: Endkonzentration = 10^{-1} mg/ml Zell-
suspension.
Ampulle: 250 mg/5 ml.
Nach analoger Berechnung ergibt sich =
Stammlösung 2 mg/ml.

Konzentration aus der Ampulle 250 mg/
5 ml = 50 mg/ml.

Um die gewünschte Konzentration der
Stammlösung zu erzielen, muß man im
Verhältnis 1:25 verdünnen.

Ausführung:
0,1 ml aus der Ampulle + 2,4 ml TCM

4-Hydroperoxycyclo-
phosphamid:

Endkonzentration = 10^{-1} mg/ml Zell-
suspension.

Stammlösung: 1 mg/0,5 ml.

Alle Zytostatika werden vor jedem Experiment neu ange-
setzt; die Substanzen und die 5-Fluorouracilampulle
werden sonst normal im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt.

II. 2.4. Radioaktive Substanzen:

(6-3H)-Thymidin (spez.Akt. 20-30 Ci/mmol) TRK 61

(G-3H)-Uridin (spez.Akt. 2-10 Ci/mmol) TRK 27

Desoxy (6-3H)-Uridin (spez.Akt. 10 Ci/mmol) TRK 242

Amersham Buchler GmbH, 33 Braunschweig, Postfach 1120

In jedes Röhrchen werden 2,5 μ Ci/mmol Zellsuspension
zur Markierung benötigt. Dementsprechend werden die
radioaktiven Substanzen verdünnt, so daß man 2,5 μ Ci/50 μ l
in jedes Teströhrchen (900 μ l Zellsuspension 50 μ l
Zytostatika) einpipettiert. (VOLUME)

Aufbewahrung: Die radioaktiven Substanzen werden vor-
schriftsmäßig geschützt im Kühlschrank bei 4°C aufbe-
wahrt.

Verwendung im Experiment: Zur Markierung der nach 2-
stündiger Inkubation mit Zytostatika noch intaktbleibenden
Zellen bzw. deren Nucleinsäuresynthese.

II. 2.5. Sonstiges

- Gaze (Stabilitex, Art.Nr. F-200, Schweizerische Seiden-
fabrik AG, Zürich).

Aufbewahrung: Vor jedem Experiment wird ein kleines
Stück zusammen mit dem Präparierbesteck sterilisiert.

Verwendung beim Experiment: Filtration der Zelle.

- Neubauer - Zählkammer, Leukopipette und 3%ige Essigsäure zur Einstellung einer definierten Zellzahl.
- Whatmann-Filter (grade = 3 mm, size = 2,3 cm;
Be Ltd. England;
Bezug: Hormuth & Vetter, 6908
Wiesloch, Postfach 1348).
- Extrahieren des nicht eingebauten radioaktiven Materials:
5% Trichloressigsäure - eiskalt.
Äthanol 96% (techn.)
Äther (techn.)
- Zählung der Radioaktivität (cpm)
Scintillationsröhrchen
Toluol p.a. (Merck).
Scintol 3 (Koch-Light Laboratories Ltd., England)

Die verwendete Scintillationsflüssigkeit = 85 ml Scintol
zu 2,5 l Toluol.

II. 3. METHODIK

Unserem Versuchsprotokoll lagen die Ausführungen zur Methode nach VOLM zugrunde, wie sie von 9 Universitätsfrauenkliniken im Rahmen einer kooperativen Studie zur prätherapeutischen Sensibilitätstestung gynäkologischer Karzinome auf Zytostatika erarbeitet wurden.

II. 3.1. Ausführung

1. Transport des durch Operation gewonnenen Tumormaterials in einem Glasgefäß mit Hanks-Lösung unter sterilen Bedingungen ins Labor.
2. Abpräparieren von Blutkoageln, Nekrosen, Fett- und Muskelgeweben mit sterilem Präparierbesteck aus dem Tumorgewebe.

Bei weicher Konsistenz des Tumorgewebes lassen sich durch leichtes Reiben auf einen kleinen Reiber kleinste Gewebspartikel gewinnen, die dann mit Hanks-Lösung aufgeschwemmt werden.

Bei harter Konsistenz des Tumorgewebes wird es mit Hilfe von zwei sterilen Injektionsnadeln zerkleinert.

Um die Zellen aus den gewonnenen kleinen Gewebspartikeln zu isolieren, wird die Suspension mit einer 2 ml Glaspipette (mit abgeschlagener Spitze) längere Zeit auf- und abpipettiert.

Schließlich werden die Zellen durch eine feine Gaze filtriert und in Röhrchen aufgefangen.

3. Abzentrifugieren (5 Min. bei 200 x g); dekantieren des Überstandes, anschließend mit Hanks-Lösung waschen.

4. Dekantieren der Hanks-Lösung. Resuspension der Zellen in 2 ml TCM lgg.
5. Anfertigung eines Ausstriches aus der Zellsuspension zur zytologischen Beurteilung.
6. Einstellen der Zellzahl in Neubauer-Zellkammer auf 500.000 Zellen/ml.

- Mit einer Leukopipette wird die Zellsuspension bis zur Marke 0,3 aufgezogen; dann mit 3%iger Essigsäure bis zur Marke 1,1 aufgefüllt und gut 6 Min. geschüttelt. Die Zellsuspension wird dadurch 20mal verdünnt.
- Die ersten Tropfen werden verworfen.
- Zählung in Neubauer-Zählkammer nach Prinzip der Leukozyten-Zählung:
 - Anfeuchten der Ränder der dünnen Glasdecke.
 - Die Glasdecke leicht auf die Balken der Neubauer-Zählkammer andrücken, so daß der Newton'sche Ring sichtbar wird.
 - Beim Auftreten des Newton'schen Ringes ist die Höhe der Glasdecke 0,1 mm.
 - Zählung der Zellen in den äußeren Quadranten, daraus den Mittelwert ziehen = n.

Für das Experiment wird auf Konzentration 500.000 Zell./ml eingestellt.

Deshalb: $\frac{\dots \text{ Mio.}}{0,5} =$

Verdünnung = 1 : ... oder 2:

7. Verteilung der Zellsuspension jeweils 0,9 ml in 13 oder 14 Versuchsröhrchen.
Anschließend 15-minütige Vorinkubation.

Das Pipettieren der Cytostatika in steigender Konzentration

Kinetikröhrchen

Es werden jeweils 50 µl Zytostatika bei der jeweiligen Konzentration (1-, 10- oder 100 therapeutische Menge) in jedes Versuchsröhrchen einpipettiert.

Cp₀; Cp₁; Cp₁₀; Cp₁₀₀; MTX₀; MTX₁; MTX₁₀; MTX₁₀₀ usw.;
bei jedem Zytostatikum fängt man mit der niedrigsten
Konzentration an und endet mit der höchsten. Der
Zeitabstand zwischen den einzelnen Gaben wird regelmäßig
gehalten: 1/2 Min.

- 22 -

anschließend werden die radioaktiv markierten Substanzen: 50 µl ^3H -Thymidin in das eine und 50 µl Uridin in das andere Röhrchen zur sofortigen Markierung der Nucleinsäuresynthese hinzugeben.

9. 2-stündige Inkubation

a) In der Zeit versucht man die Aktivität der Nucleinsäuresynthese zu erfassen (KINETIK), in dem aus dem Kinetikröhrchen nach 30, 60, 90, 120 und 150 Min. jeweils 2 x 100 µl abpipettiert (Doppelansatz), auf die markierten Whatmann-Filter aufgetragen und in heißer Luft abgetrocknet werden.

b) Markierung der Whatmann-Filter für die weitere Auftragung (mit Bleistift beschriften).

10. Markierung mit entsprechenden radioaktiven Vorläufern

Nach derselben Reihenfolge und dem Zeitabstand werden jeweils 50 µl radioaktive Vorläufer in die entsprechenden Röhrchen einpipettiert:

- ^3H -Thymidin für Cyclophosphamid
- ^3H -Desoxyuridin für Methotrexat
- ^3H -Desoxyuridin für 5-Fluorouracil
- ^3H -Uridin für Adriamycin

Anschließend eine einstündige Inkubationszeit.

11. Abschrecken der ganzen Röhrchen in kaltem Wasser. Auftragen von jeweils 100 µl aus jedem Versuchsröhrchen auf mit Bleistift beschriftete Whatmann-Filter; dabei müssen die Reihenfolge und Zeitabstand gehalten werden. In heißer Luft trocknen.

12. Extrahieren

Die trockenen Whatmann-Filter werden zur Extraktion des nicht eingebauten radioaktiven Materials:

- 2 x in eiskalte 5%-ige Trichloressigsäure (TCA) eingebracht; jeweils 30 Min., 100 Filter auf 1 l TCA.

Anschließend =

- 20 Min. in 1:1 Athanol/Äther-Mischung
 - 10 Min. in Äther
- Lufttrocknung.

13. Die trockenen Whatmann-Filter werden in Zählröhrchen, die mit je 8 ml Scintillationsflüssigkeit überschichtet sind, eingebracht.

Schließlich erfolgt die Messung der radioaktiven Impulse/Std. (=Cpm) im Scintillationszähler.

14. Auswertung

- a) der Kinetik
- b) der Hemmwirkung

II. 3.2. Kontrollen

Am Ende jeder Zellsuspensionsgewinnung (siehe Schritt 5) wurde ein Ausstrich zur zytologischen Beurteilung angefertigt. Der Ausstrich wurde nach Papanicolau gefärbt und beurteilt. Negativ ausgefallene Befunde wurden später für das Ergebnis nicht verwendet.

Zellsuspension mit viel nekrotischem Material - zytologisch feststellbar - wurde ebenfalls verworfen.

Am Ende der Reaktionskette (siehe Schritt 11) wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt, indem eine Doppelbestimmung vorgenommen wurde: Anstatt auf ein bereits beschriftetes Whatmann-Filter wurde auf 2 Filter jeweils 100 µl aus jedem Versuchsröhrchen aufgetragen. Lagen dann 2 Zählwerte (Cpm) über 30% auseinander, wurden diese Ergebnisse nicht verwertet.

III. 1. ERGEBNISSE BEI OVARIALKARZINOM

III. 1.1. Gewinnung der Zellsuspension

In 11 Fällen stammte das Tumormaterial aus frischem Operationspräparat, in 2 Fällen aus Aszitespunktat, einmal aus Pleurapunktat.

Die Gewinnung einer homogenen Zellsuspension war bei der meist weichen Konsistenz des Gewebes (es handelte sich vorwiegend um Adenokarzinome) unproblematisch. Bei einem Fall bildeten sich Zellklumpen, bei der späteren Zählung der Einbaurate registrierte man Schwankungen, so daß die Ergebnisse aus dieser Zellsuspension nicht ausgewertet wurden.

Die Gewinnung der Zellsuspension aus Aszites- bzw. Pleurapunktat ging analog vor sich; es wurde abzentrifugiert (5 Minuten bei 200xg), wie bei Schritt 3 beschrieben und analog weiter verarbeitet.

Die Zellsuspension aus Aszitespunktat war homogen; bei der aus Pleurapunktat gewonnenen dagegen bildeten sich Zellklumpen.

III. 1.2. Zytologie

In 2 von 11 Fällen war der zytologische Befund negativ; bei einem Fall zweifelhaft, so daß die Entscheidung der Verwertbarkeit von dem histologischen Befund abhängig gemacht werden mußte; bei einem Fall enthielt der mikroskopische Ausstrich nekrotisches Material. Die negativen Befunde wurden aus der Auswertung ausgeschlossen.

III. 1.3. Einbaurate (Cpm) radioaktiver Präkusoren

Die Einbaurate der radioaktiven Präkusoren bewegte sich bei Ovarialkarzinomen zwischen 300 bis 600 Cpm.

Bei einem Fall (siehe III. 1.), wo die Gewinnung einer Zellsuspension problematisch war, zeigte sich, daß die Einbaurate schwankte.

Bei nekrotischem Material im zytologischen Ausstrich war die Einbaurate erwartungsgemäß negativ bzw. niedrig.

Bei dem bereits erwähnten Pleurapunktat waren die Werte hoch, schwankten jedoch - wie erwartet - sehr stark im doppelten Versuchsansatz. Dagegen fielen entsprechende Werte beim Aszitespunktat sehr niedrig aus, zwischen 200 bis 300 Cpm - bei geringen Schwankungen.

III. 1.4. Kinetik

Wie in der Einführung bereits ausgeführt (siehe Seite 5 im Kapitel I.3. Die "In-vitro-Sensibilitätstestung" von Zytostatika mit radioaktiven Nucleinpräkusoren) zeigten VOLM, M., KAUFMANN, M., HINDERER, H. und GOERTILLER, KL. 1969, daß eine Beziehung zwischen der Einbaurate radioaktiv markierter DNA bzw. RNA-Präkusoren und der Zeit besteht. Diese "Kinetik" gilt als Maß für die Zellaktivität und Teilungsrate.

Zellsuspensionen mit hohem Anteil an nekrotischem Material zeigen erwartungsgemäß keinen Anstieg der Einbaurate.

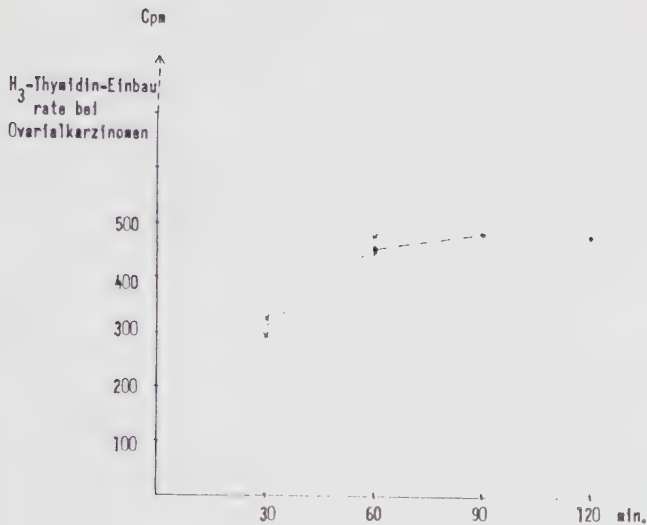


Abbildung 2

Abbildung 2 zeigt einen typischen Kurvenverlauf bei vitalen Zellsuspensionen mit zunehmender Einbaurrate pro Zeiteinheit. Solche eindeutig verwertbaren Ergebnisse waren in 5 von insgesamt 11 Fällen zu erzielen.

Dem ersten steilen Anstieg bis 60 Minuten folgte in allen obengenannten 5 Fällen regelmäßig ein flacherer Kurvenverlauf bis 120 Minuten.

In 4 Fällen wurde der Einbau von ^3H -Thymidin und ^3H -Uridin verfolgt.

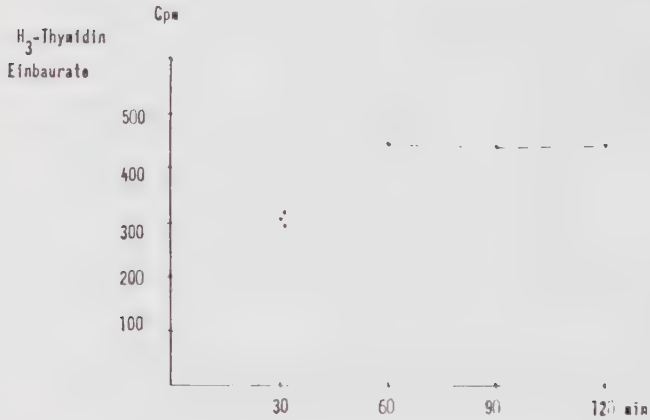


Abbildung 3

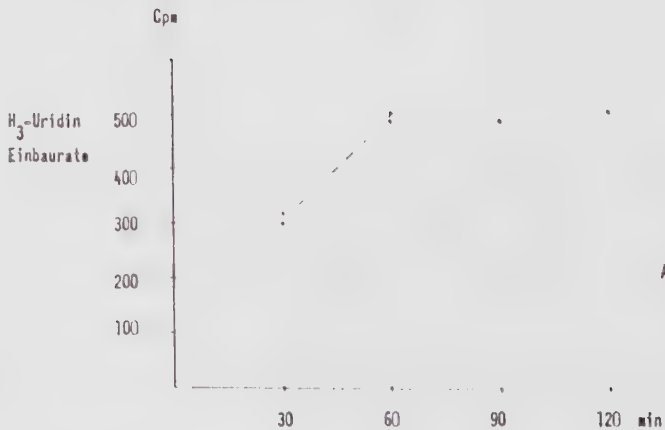


Abbildung 4

Der Anstieg der Uridin-Einbauraten in der Zeit zwischen 30 bis 60 Minuten war in allen 4 Fällen steiler als der von Thymidin.

III. 1.5. Hemmung bzw. Abfall der Einbaurate nach Zytostatikagabe bei "In-vitro-Resistenztestung"

Nach Gabe der Zytostatika in alle Versuchsröhrchen und der daran anschließenden 2-stündigen Inkubationszeit wurde die Markierung mit entsprechenden radioaktiven Präkusoren durchgeführt (siehe Schritt 8-10).

Tabelle 1 zeigt die Hemmung bzw. den Abfall der Einbaurate nach Zytostatikagabe (in 10-facher Konzentration der therapeutischen Dosierung) in Prozent (%), bezogen auf die Einbaurate von "unbehandelten" Kontrollproben.

In 10-facher Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4-hydroperoxy- cyclophosphamid	15%	25%	---	---	12%	?	20%	16%	10%	30%	---	65%	30%
Methotrexat	15%	35%	---	---	---	30%	---	15%	---	39%	---	62%	40%
5-Fluorouracil	20%	30%	---	---	23%	35%	45%	20%	35%	40%	---	50%	32%
Adriamycin	---	---	---	25%	---	13%	---	14%	35%	50%	---	60%	10%

Tabelle 1

--- Hemmung kleiner als 10%

Hemmung größer als 35%

? Hemmung zwischen 25%-35%

Die obengenannten Grenzwerte (10%, 25%, 35%) sind, dies sei ausdrücklich betont, willkürlich gesetzt.

Zeigt ein Tumor (entspricht also einer Zellsuspension) eine Hemmung über 35% bei mehreren Zytostatika, so wurde er als sensibel eingestuft.

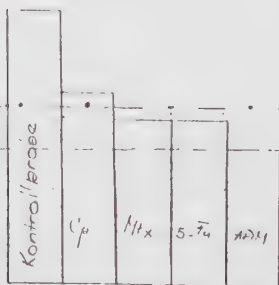
Findet man bei einem Tumor eine Hemmung über 35% nur bei einem Zytostatikum und mehrere zwischen 25%-35% bei mehreren Zytostatika, so wurde er als "bedingt sensibel" eingestuft.

POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und ERHART, H., 1976, setzten die Grenzwerte auf 30% bzw. 50%. (Zytostatika, die in ihrer jeweils höchsten Testkonzentration eine Einbauverminderung von weniger als 30% und bei entsprechender 10-fach geringerer Konzentration von weniger als 50% gegenüber den Kontrollwerten erbrachten, wurden für unwirksam erachtet.)

BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. und Mitarbeiter, 1975, setzten eine "50%-Grenze" in Anlehnung an Tierversuche von VOLM, M. und Mitarbeitern, 1973.

Die auf Seite 45 aufgeführte klinische Auswertung wird zeigen, ob die hier verwendete Einstufung bzw. Grenzziehung richtig wäre, oder einer Korrektur bedarf.

Wie aus der summarischen Darstellung von Tabelle 1 ersichtlich, war in 2 Fällen die Einbauhemmung nach Zytostatika-Gabe eindeutig feststellbar (Fall 10 und 12).



Fall 10

Abb. 5

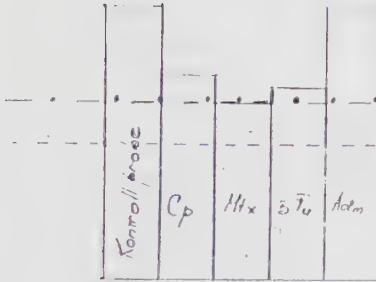


Fall 12

Abb. 6

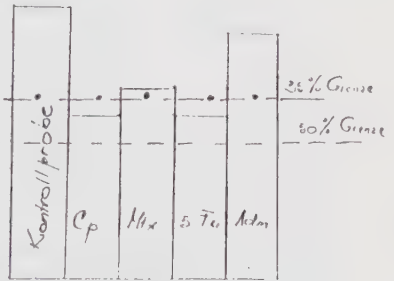
Sie können also als "sensibel" eingestuft werden.

In den Fällen 2 und 13 war eine Einbauhemmung noch gut erkennbar; sie können also als "bedingt sensibel" eingestuft werden.



Fall

Abb. 7



Fall 13

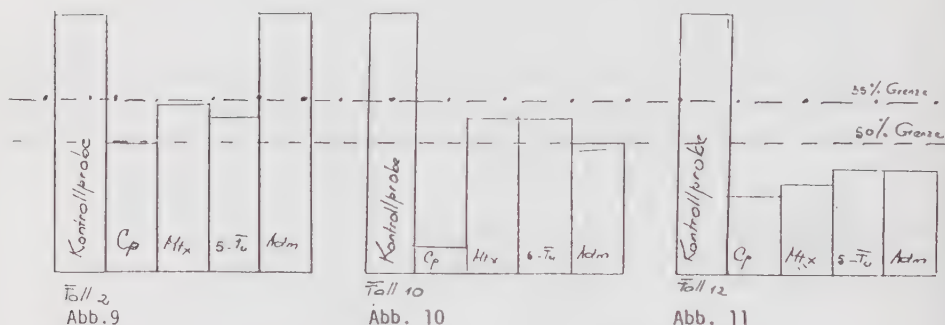
Abb. 8

Tabelle 2 ist analog der Tabelle 1, bei Gabe von Zytostatika in 100-facher therapeutischer Menge.

100-fache Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
4-hydroxypereoxy cyclophosphamid	15%	52%	---	---	25%	---	20%	15%	?	93%		70%	
Methotrexat	45%	35%	---	---	---	35%	35%	14%	15%	36%		65%	
5-Fluorouracil	20%	40%	---	---	23%	48%	50%	20%	35%	40%		60%	
Adriamycin	---	---	---	20%	?	26%	?	14%	30%	50%		60%	

Tabelle 2

Wie aus der Tabelle 2 ersichtlich, war in 3 Fällen die Einbauehemmung nach Zytostatikagabe eindeutig feststellbar (Fall 10, 2 und 12). Fall 11 und 13 konnten mangels Zellsuspension nicht durchgeführt werden.



Sie können also als "sensibel" eingestuft werden.

Bei Fällen 6 und 7 war die Verminderung der Einbaurrate nach Zytostatikawirkung noch gut erkennbar; sie können also als "bedingt sensibel" eingestuft werden.

Vergleicht man nun die Ergebnisse aus der Tabelle 1 mit denen aus der Tabelle 2, so ließ sich feststellen, daß sie sich im wesentlichen decken: Von insgesamt 11 Fällen (denn 2 Fälle waren nicht verwertbar) sind 6 eindeutig resistent und die restlichen 5 Fälle "bedingt sensibel" und "sensibel".

Es zeigt sich, daß eine Zellsuspension bzw. ein Karzinomgewebe, das sensibel gegen ein Zytostatikum ist, meistens gleichzeitig gegen mehrere Zytostatika empfindlich ist. (Siehe Fälle 2, 6, 7, 10, 12).

Dies haben BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. und Mitarbeiter bereits 1975 festgestellt.

III. 2. ERGEBNISSE BEI MAMMAKARZINOM

III. 2.1. Gewinnung der Zellsuspension

Das Tumormaterial zur Gewinnung der Zellsuspension stammte in allen 12 Fällen aus frischem Operationsmaterial.

Die Gewinnung einer homogenen Zellsuspension war in der Mehrzahl problematisch. In einem Fall war es wegen szirrhotischer Konsistenz des Gewebes unmöglich, in 7 Fällen schwierig (in diesen Fällen bildeten sich Zellklumpen durch schlecht erhaltene Karzinomzellgruppen) und 4 mal relativ leicht (es handelte sich um solide Adenokarzinome).

III. 2.2. Zytologie

In 3 von 12 Fällen fehlt ein eindeutiger zytologischer Befund, sie wurden deshalb aus der Auswertung ausgeschlossen.

Der Ausstrich von 5 zytologisch-positiven Befunden enthielt teils schlecht erhaltene Karzinomzellen, teils Zellzerfallsmaterial; ihre Ergebnisse wurden mit Einschränkung zur Auswertung herangezogen.

Eindeutig auswertbar sind nach dem zytologischen Befund die 4 Fälle, bei denen die Gewinnung der Zellsuspension relativ leicht war (siehe unter III.2.1.).

III. 2.3. Einbaureate (Cpm) radioaktiver Präkusoren

Die Einbaureate der radioaktiven Präkusoren bewegte sich bei Mammakarzinomen zwischen 200 bis 600 Cpm.

Bei oben erwähnten 5 Fällen, in deren Ausstrich schlecht erhaltene Karzinomzellen zu finden waren, schwankte die Einbaureate (Cpm) erwartungsgemäß im doppelten Versuchsansatz. Die späteren Zählwerte dieser Zellsuspensionen wurden zur Auswertung mit Einschränkung herangezogen.

Von 4 "unproblematischen" Fällen - bereits bei Zellsuspensionsgewinnung und Zytologie erwähnt - zeigten 2 Fälle eine hohe Einbaurate (zwischen 400 bis 600 Cpm), 2 mal ganz niedrige (200 bis 300 Cpm); in allen aber bei geringen Schwankungen im doppelten Versuchsansatz.

III. 2.4. Kinetik

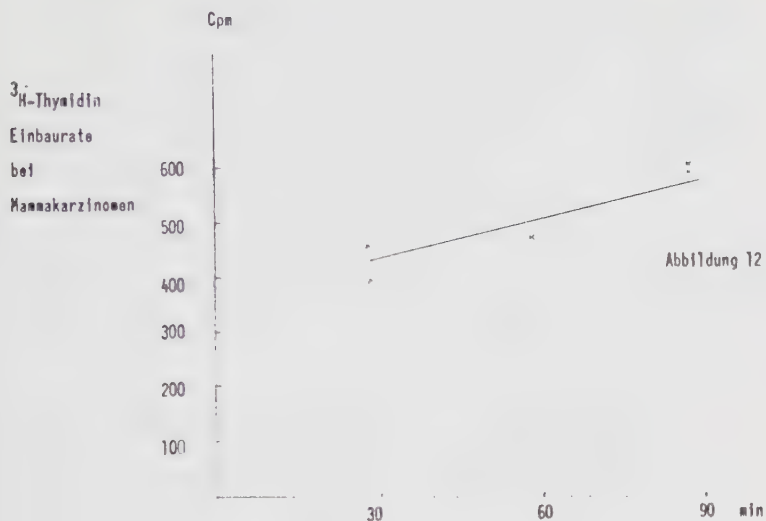


Abbildung 12 zeigt einen typischen Kurvenverlauf bei vitalen Zellsuspensionen mit zunehmender Einbauraten pro Zeiteinheit. Solche eindeutig verwertbaren Ergebnisse waren in 5 von insgesamt 11 Fällen zu erzielen.

III. 2.5. Hemmung bzw. Abfall der Einbauraten nach Zytostatikagabe bei "In-vitro-Resistenztestung"

Tabelle 3 zeigt die Hemmung bzw. den Abfall der Einbauraten nach Zytostatikagabe (in 10-facher Konzentration der therapeutischen Dosierung) in %, bezogen auf die Einbauraten von "unbehandelten" Kontrollproben.

Mammakarzinome

10-fache Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4-hydroxyperoxy cyclophosphamid	23%	7	25%	20%	15%	---	---	---	---	---	---
Methotrexat	---	27%	35%	35%	---	7	---	---	---	---	---
5-Fluorouracil	---	27%	25%	25%	---	33%	---	---	---	---	---
Adriamycin	12%	---	---	---	25%	40%	12%	---	---	---	---

Tabelle 3

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Ovarialkarzinomen sind die von Mammakarzinomen - wie aus der Tabelle 3 ersichtlich - nicht eindeutig zu verwerten; man findet keinen Fall, der eine Hemmung über 35% bei mehreren Zytostatika zeigt.

Experimente Nummer 3, 4, 6 deuten eine Sensibilität gegen Zytostatika an.

Tabelle 4 - analog Tabelle 3 in 100-facher Konzentration der therapeutischen Dosierung - soll die Tendenzen verdeutlichen.

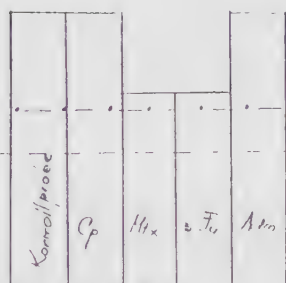
Mammakarzinome

100-fache Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
4-hydroxyperoxy cyclophosphamid	23%	7	7	---	15%	---	---	---	---	---	---
Methotrexat	---	37%	---	10%	---	14%	---	---	---	---	---
5-Fluorouracil	15%	27%	45%	25%	19%	---	---	---	---	---	---
Adriamycin	57%	---	---	---	20%	15%	12%	---	---	---	---

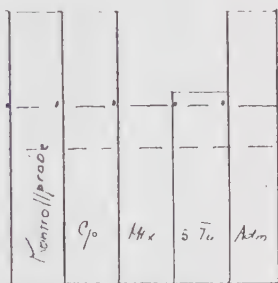
Tabelle 4

Tabelle 4 zeigt keinen eindeutigen "sensiblen Fall".

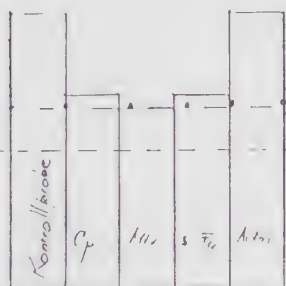
Vergleicht man nun die Ergebnisse der Tabelle 3 und 4, so ist eindeutig daraus ersichtlich, daß 8 von 11 Fällen völlig resistent und 3 Fälle "bedingt sensibel" sind (Fall 2, 3, 4).



Fall 1 10 f th. Dosis
Abb. 13

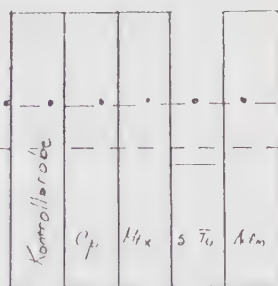


Fall 2 100 f th. Dosis

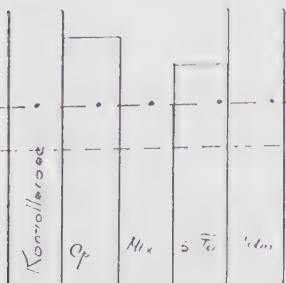


Fall 3 10 f th. Dosis

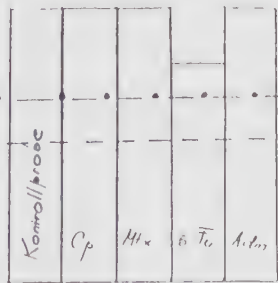
Abb. 14



Fall 3 100 f th. Dosis



Fall 4 10 f th. Dosis
Abb. 15



Fall 4 100 f th. Dosis

III. 3. ERGEBNISSE BEI CORPUS(ENDOMETRIUM)-KARZINOM

III. 3.1. Gewinnung der Zellsuspension

Das Tumormaterial zur Gewinnung der Zellsuspension stammte in 9 Fällen aus frischem Operationsmaterial, in einem Fall handelte es sich um ein Rezidiv im Scheidenblindsack.

Die Gewinnung einer homogenen Zellsuspension war insgesamt leicht, denn in den meisten Fällen handelte es sich um Adenokarzinome.

III. 3.2. Zytologie

Der zytologische Befund war in allen 10 Fällen positiv. In 2 Ausstrichen wurden nekrotische Zellverbände gefunden, sie werden deshalb nicht zur Auswertung einbezogen.

III. 3.3. Einbauraten (Cpm) radioaktiver Präkusoren

Die Einbauraten der radioaktiven Präkusoren bewegte sich bei Corpus(Endometrium)-Karzinomen zwischen 200 bis 600 Cpm.

Beim doppelten Versuchsansatz zeigten 2 Fälle leichte Schwankungen; sie werden zur Auswertung noch herangezogen.

III. 3.4. Kinetik

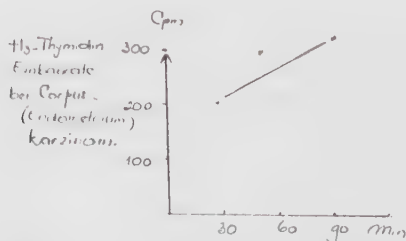


Abb. 16

Abbildung 16 zeigt einen typischen Kurvenverlauf bei vitalen Zellsuspensionen mit zunehmender Einbaurrate pro Zeiteinheit. Solche eindeutig verwertbaren Ergebnisse waren in 4 von insgesamt 10 Fällen zu erzielen.

Wie Abbildung 16 gezeigt hat, ist der Anstieg der Einbaurrate pro Zeiteinheit bei Corpus(Endometrium)-Karzinomen schwach. Vergleicht man diesen Kurvenverlauf mit beiden vorherigen (Kinetik von Ovarialkarzinomen und Mammakarzinomen), ließ es sich feststellen, daß es eindeutig flacher verläuft, als die beiden vorherigen.

III. 3.5. Hemmung bzw. Abfall der Einbaurrate nach Zytostatikagabe bei "In-vitro-Resistenztestung"

Tabelle 5 zeigt die Hemmung, bzw. den Abfall der Einbaurrate nach Zytostatikagabe (in 10-facher Konzentration der therapeutischen Dosierung) in %, bezogen auf die Einbaurrate von "unbehandelten" Kontrollproben.

Corpus(Endometrium)-Karzinome

10-fache Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4-hydroxyperoxy cyclophosphamid	---	20%	1	---	11%	---	---	1	---	10%
Methotrexat	---	---	20%	---	28%	---	1	---	---	10%
5-Fluorouracil	---	---	40%	---	---	---	---	27%	---	15%
Adriamycin	---	17%	15%	---	---	---	18%	36%	---	---

Tabelle 5

Bereits die summarische Darstellung der Ergebnisse bei Corpus(Endometrium)-Karzinomen in Tabelle 5 zeigt eindeutig, daß eine Verminderung der Einbaurate durch Zytostatikagabe nicht zu erzielen ist. Bei Fall 3 und 8 sind Anzeichen für Zytostatikaansprechbarkeit.

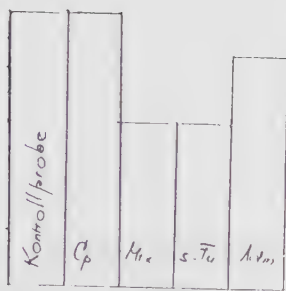
Tabelle 6 ist analog der Tabelle 5, bei Gabe von Zytostatika in 100-facher Konzentration der therapeutischen Dosierung. Sie soll die in Tabelle 5 erkennbaren Anzeichen verdeutlichen.

Corpus(Endometrium)-Karzinome

100-fache Therapiedosis	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
4-hydroxyperoxy cyclophosphamid	---	22%	?	---	---	---	20%	57%	---	20%
Methotrexat	---	---	37%	---	15%	---	---	---	---	18%
5-Fluorouracil	---	---	40%	10%	18%	---	---	?	---	---
Adriamycin	---	17%	15%	---	---	---	18%	36%	---	---

Tabelle 6

Wie aus der Tabelle 6 ersichtlich, ist ein Abfall der Einbaurate der radioaktiven Präkusoren durch Zytostatikagabe bei den beiden Fällen 3 und 8 feststellbar.



Fall 3 roof th. Doors

Abb.17



Fall 8 roof th. Doors

Von insgesamt 10 Fällen sind 8 eindeutig resistent
und 2 Fälle "bedingt sensibel".

III. 4. ZUR FESTSTELLUNG VON KORRELATION ZWISCHEN "IN-VITRO-RESISTENZTESTUNG" UND KLINISCHEM VERLAUF

III. 4.1. Mit Zytostatika behandelte Patientinnen

15 Patientinnen wurden postoperativ mit Zytostatika behandelt. 10 davon waren an Ovarialkarzinom erkrankt, 2 an Mammakarzinom und bei 2 Patientinnen wurde ein Doppelkarzinom gefunden; einmal ein malignes Lymphom in beiden Mammæ und in beiden Ovarien, und im anderen Fall handelte es sich um ein Karzinosarkom des Uterus sowie der beiden Ovarien.

In etwa der Hälfte der histologischen Befunde wurde der Verdacht auf Fernmetastasen geäußert.

III. 4.2. Klinische Durchführung der Zytostatika-Behandlung

Eine Polychemotherapie wird in aller Regel nach CMF-Schema durchgeführt. Vineristin, 5-Fluorouracil und Endoxan werden hauptsächlich verabreicht, am 1. und 8. Tag zusätzlich Methotrexat. Adriamycin wird sehr selten verwendet. Bei Aszitesbildung wird Thiothepa installiert. Die Stoßtherapie wird in Abständen von 3-4 Wochen durchgeführt.

III. 4.3. Korrelation zwischen "In-vitro-Resistenztestung" und dem klinischen Verlauf

In Anlehnung an die Kooperativen Studie der Sensibilitätstestung der Tumoren (KSST) 1980 wird die Überlebenszeit der Patientinnen als ein wichtiger Parameter des klinischen Verlaufs angesehen. Eine Zusammenstellung der In-vitro-Testergebnisse und der Überlebenszeit zeigt die Tabelle 7.

Die durchschnittliche (mittlere) Überlebenszeit aller Patientinnen (innerhalb der Beobachtungsperiode) beträgt 468 Tage, von Patientinnen mit "resistenten" Tumoren 270 Tage und die von "sensiblen" und "bedingt sensiblen" 578 Tage.

Eine Korrelation zwischen In-vitro-Testergebnissen und klinischem Verlauf ist insofern bewiesen, als die durchschnittliche Überlebenszeit von Patientinnen mit resistenten Tumoren unter der durchschnittlichen mittleren Überlebenszeit aller Patientinnen liegt und die von "sensiblen" bzw. "bedingt sensiblen" darüber.

Erläuterung zu Tabelle 7

Pat. Nr. 1 - 10: Ovarialkarzinom

Pat. Nr. 11 u. 12: Mammakarzinom

Pat. Nr. 13 u. 14: Corpus(Endometrium-)Karzinom

sens. = sensibel: Hemmung der Einbaurate bei Gabe entsprechender Zytostatika zwischen 25 u. 35%

res. = resistent: keine Hemmung bzw. kleiner als 25%

Ø = kein Ergebnis

Patientinnen	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
4-00h-CTX	10-fache Therapie- dosis	res.	res.	res.	res.	res.	res.	sens.	bed. sens.	bed. sens.	res.	bed. sens.	res.	res.
	100-fache Therapie- dosis	res.	sens.	res.	res.	res.	res.	sens.	∅	sens.	∅	∅	res.	res.
	10-fache Therapie- dosis	res.	bed. sens.	res.	bed. sens.	res.	res.	sens.	bed. sens.	bed. sens.	bed. sens.	res.	res.	res.
	100-fache Therapie- dosis	res.	bed. sens.	res.	bed. sens.	res.	res.	sens.	∅	bed. sens.	∅	∅	res.	res.
5 - FU	10-fache Therapie- dosis	res.	bed. sens.	res.	sens.	bed. sens.	res.	bed. sens.	bed. sens.	bed. sens.	res.	res.	res.	res.
	100-fache Therapie- dosis	res.	bed. sens./ sens.	res.	sens.	bed. sens.	bed. sens.	sens.	∅	bed. sens.	bed. sens.	∅	res.	res.
Adm	10-fache Therapie- dosis	∅	res.	res.	res.	res.	res.	sens.	res.	res.	∅	res.	res.	res.
	100-fache Therapie- dosis	∅	res.	res.	bed. sens.	res.	bed. sens.	sens.	∅	sens.	res.	∅	res.	res.
	Überlebenszeit (Tage)	270	1260	390	1200	270	300	240	210	120	270	1200	240	210

Tabelle 7

IV. DISKUSSION

IV. 1. Reproduzierbarkeit der VOLM-Methode

Es konnte gezeigt werden, daß die von VOLM beschriebene Methode am eigenen Material reproduzierbar ist. Im Vergleich zu den älteren Langzeitmethoden (Organ- bzw. Gewebekultur) ist diese Methode eindeutig kürzer und einfacher durchzuführen, wenn auch zeitlich für die Routine recht aufwendig (5 bis 6 Stunden). Die benötigten Mengen an Zytostatika und radioaktiv markierten Nukleinsäurepräkusoren sind niedrig; was einen Vorteil für die Routine bedeutet.

Bei ausgedehnten Versuchen an Tiertumoren und in Pilotstudien mit menschlichen Tumoren wurde der Therapieerfolg mit Testergebnissen verglichen und eine gute Übereinstimmung der In-vitro-in-vivo Ergebnisse gefunden (VOLM, M., AUFMANN, M., MATTERN, J. und WAYSS, K., 1975, 1976, 1979). Dies ist natürlich die Voraussetzung, die In-vitro-"Sensibilitäts-testung" als eine prätherapeutische Untersuchungsmethode der zytostatischen Behandlung anzuwenden.

IV. 2. Die Bedeutung der "In-vitro-Resistenztestung" als prätherapeutische Untersuchungsmethode

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen weisen darauf hin, daß es möglich ist, prätherapeutisch die gegenüber Zytostatika resistenten Tumoren zu ermitteln. Die Überlebenszeit von Patientinnen, deren Tumorgewebe in der In-vitro-"Resistenztestung" als völlig resistent nachgewiesen worden sind, liegt niedriger als die durchschnittliche mittlere Überlebenszeit aller Patientinnen; bei "sensiblen" bzw. "bedingt sensiblen" Fällen liegt sie weit darüber. Ist ein Tumor in In-vitro-"Sensibilitätstestung" als resistent nachgewiesen worden, empfiehlt sich eine zytostatische Behandlung nicht. Dadurch können Patienten vor unumgänglich schweren Nebenwirkungen der Zytostatika bewahrt und gezielter mit anderen Therapiemöglichkeiten behandelt werden.

POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und EHRHART, H. (1976) konnten mit hoher Sicherheit die gegenüber den untersuchten Tumoren wirkungslosen Zytostatika aufzeigen. Sie wurden dann aus den klinischen Therapieprogrammen einer Patienten-Gruppe eliminiert. Nach einem Beobachtungszeitraum von 8 Wochen ist in keinem Fall dieser Gruppe die Progression des Tumorwachstums aufgetreten. Durch prätherapeutische Kenntnis wirkungsloser Zytostatika kann der Patient vor überflüssiger und zusätzlicher schädigender Wirkung bewahrt werden.

IV. 2.1. Literaturvergleich

Ähnlich wie POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und EHRHART, H. (1976) fanden auch LIMBURG, H. und HECKMANN, H. (1969) und WHEELER, T.K., DENDY, P.P. und DAWSON, A. (1974), daß Patienten, deren Tumore entsprechend den Testergebnissen behandelt wurden, signifikant längere Überlebenszeit hatten. Dies konnten dagegen EBELING, K. und SPITZ-BART, H. (1977) und NISSEN, E., TANNEBERGER, S. und Mitarbeiter (1978) nicht finden.

BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIJSSEN, H. und Mitarbeiter (1975) stellten fest, daß eine Zellsuspension bzw. ein Karzinomgewebe, das sensibel ist gegen ein Zytostatikum, meistens gleichzeitig gegen mehrere Zytostatika empfindlich ist.

Diese Feststellung kann durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden. Sie ist aufgrund der proliferations-abhängigen Wirkungen von Zytostatika verständlich; proliferiert sich ein Tumor und ist deshalb empfindlich gegen ein Zytostatikum, so wird dieser Tumor auch bei anderen Zytostatika ähnliche Wirkung zeigen (in der Kooperativen Studie für Sensibilitätstestung von Tumoren, KSST, 1980).

Die In-vitro-"Sensibilitätstestung" soll also weniger dazu verwendet werden das wirksamste Zytostatikum herauszufinden, sondern lediglich um zu klären, ob ein Tumor überhaupt auf eine zytostatische Behandlung anspricht.

Ovarialkarzinome sprechen besser auf eine zytostatische Behandlung an als andere gynäkologische Tumoren. Dies haben bereits LIMBURG, K. und KRAHE (1964) und HECKMANN (1967) an Gewebekulturen festgestellt. Die vorliegende Arbeit kann diese Feststellung anhand der In-vitro-"Sensibilitätstestung" bestätigen. Bei Untersuchungen an Ovarialkarzinomen von mehr als 100 Patientinnen von PFLEIDERER, H. und KIYAN, S. (1967), SMITH, J., RUTLEDGE, F., WHARTON, T. (1972) und YOUNG, R. (1975) mit Alkylantien wurden Remissionen in 43%-51% der Fälle erzielt.

SENN, H.J. (1973) erreichte eine Remissionsquote von 63% bei Kombinationstherapie von Cyclophosphamid und Fluorouracil. Dieses Ergebnis konnte von KSST (1980), die die gleichen Kombinationspräparate in ihren Testungen verwendeten, nicht bestätigt werden. Bei ihrer Studie von 72 Patientinnen zeigten lediglich 31% eine Remission. Weiterhin stellten sie fest, daß Patientinnen mit empfindlichen Tumoren durch die obengenannte Kombinationstherapie länger lebten als Patientinnen mit resistenten Tumoren.

In der vorliegenden Arbeit liegt die durchschnittliche Überlebenszeit von Patientinnen mit empfindlichen Tumoren ("sensibel" bzw. "bedingt sensibel") weit über der mittleren Überlebenszeit aller Patientinnen.

IV. 3. Die Problematik in der Methode

IV. 3.1. Problematik aus molekular-biologischer Sicht

Der Erfolg einer zytostatischen Behandlung bei Tumoren hängt wesentlich von der Proliferation des Tumors ab (VAN PUTTEN, L.M., LELIEVELD, P., KRAM-IDSENGA, L.K.J., 1972).

Die Proliferation kann sich aber während der Kultivierung von Zellen ändern, dies wäre besonders bei langwieriger Kultivierung zu befürchten. Während der kurzen Zeit der In-vitro-"Sensibilitätstestung" (3 Stunden) bleibt der proliferative Zustand des Tumors weitgehend erhalten (HELPAP, B. und MAURER, W., 1969, LENNARTZ, K.J., KLEIN, H.O. und Mitarbeiter, 1971).

Es ist deshalb zulässig mit der kurzzeitigen In-vitro-"Sensibilitätstestung" die Proliferation und die proliferationsabhängige Zytostatika-Wirkung zu erfassen. Allerdings genügt es nicht, allein die Einbauhöhe der radioaktiven Vorläufer der Nukleinsäure als Maß für die Proliferation der Tumoren zu bestimmen. Die absolute Einbauhöhe in die Zellsuspension kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden, z.B. durch unterschiedliche Schädigung der Tumorzellen bei ihrer Isolierung (besonders bei szirrhösen Mammakarzinomen), durch Unterschiede im Nukleotid-Pool der einzelnen Tumoren (wie bereits von RAJEWSKY, M.F. 1965 und 1966 untersucht wurde), so daß Tumoren auch bei gleicher Proliferation einen unterschiedlich hohen Einbau von radioaktiven Substanzen haben können. Deshalb wurde bei jedem Tumor und bei jedem Versuchsansatz eine Bestimmung als Kontrolle durchgeführt und sie gleich 100% gesetzt. Diese methodische Möglichkeit zur Messung von Einbauraten, bzw. Hemmung nach Zytostatikagabe wurde von SEEBER, S. und SCHMIDT, C.G. (1977) kritisiert, denn es kann nicht festgelegt werden, inwieweit ein induzierter "repair"-Vorgang auch innerhalb von 2-4 Stunden den Meßwert für die Hemmung der DNA-Synthese verfälscht. Neben weiteren methodischen Problemen aus rein biochemischer Sicht wurde die Problematik durch Veränderungen der physiologischen Bedingungen in In-vitro-"Sensibilitätstestung" angesprochen, wie z.B. die vielfältigen Tumor-Wirt-Beziehungen im Sinne immunbiologischer Natur und die Vaskularisation des Gewebes. Sie werden bei der beschriebenen Methode zwangsläufig nicht berücksichtigt. Nach SEEBER und SCHMIDT erlaubt die In-vitro-"Sensibilitätstestung" allenfalls in sehr beschränktem Rahmen eine biochemisch orientierte Auswahl der Zytostatika.

Zur Verbesserung der prätherapeutischen Untersuchungsmethode zeichnet sich als In-vivo-Modell die Heterotransplantation auf sogenannten Nu-Nu-Mäusen ab (siehe bei Einführung I.5. Seite 9).

IV. 3.2. Die Problematik der Grenzziehung zwischen "sensibel" und resistent

VOLM und Mitarbeiter (1975) setzten nach umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen die "50%-Grenze" zwischen resistenten und "chemoempfindlichen" Tumoren; spricht ein Zytostatikum auf ein Tumorgewebe an und erzielt dabei eine Hemmwirkung größer als 50%, so erweist sich der Tumor als "sensibel" und das Zytostatikum als wirksam. Dies ist zur Feststellung, ob es eine Korrelation zwischen In-vitro-Ergebnissen und In-vivo-Verhalten der Tumorgewebe besteht, von großer Bedeutung. Eine gute Korrelation wurde am besten durch In-vitro-Ergebnisse bei Zytostatikazusatz in 10-facher therapeutischer Dosierung erzielt (VOLM und Mitarbeiter).

BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H. und Mitarbeiter (1975) übernahmen die "50%-Grenze" bei der Auswertung ihrer Testergebnisse. POSSINGER, K. und Mitarbeiter (1976) setzten bei ihren In-vitro-Ergebnissen die Grenze auf 30% unter Anwendung von Zytostatika in 100-facher therapeutischer Dosierung und auf 50% in 10-facher therapeutischer Dosierung.

In der vorliegenden Arbeit zeigten sich in einigen Experimenten deutliche Tendenzen, ob ein Tumorgewebe bzw. Zellsuspension von gleichzeitig mehreren Zytostatika gehemmt wird. Resistent sind deshalb Tumoren, die gar keine oder sehr schwache Hemmwirkung (kleiner als 35%) bei mehreren Zytostatika zeigten. In Anlehnung an Ausführungen in der Kooperativen Studie für Sensibilitäts-testung von Tumoren (KSST) 1980 (siehe IV.2.1. Literaturvergleich) und nach Ergebnissen am eigenen Material

wird hier betont, daß, bei mehr oder weniger "sensiblen" Tumoren, der Einbau von mehreren Zytostatika über 35% gehemmt werden soll.

Ausschlaggebend sind die In-vitro-Testergebnisse bei Zusatz von Zytostatika in 10-facher therapeutischer Dosierung; die Ergebnisse in 100-facher therapeutischer Dosierung sollen dies erhärten

Nach der Festlegung der "sensibel-resistent-Grenze" gilt zu untersuchen, ob sie mit dem klinischen Verlauf übereinstimmt. Als Maßstab des klinischen Verlaufs wird die Überlebenszeit genommen.

IV. 3.3. Einflüsse auf die Überlebenszeit

Die Überlebenszeit wird vom Tag der Operation an gerechnet und bei jeder Patientin bis Ende November 1980 verfolgt. Unberücksichtigt bleiben Einflüsse klinischer Parameter (z.B. das Alter und der Allgemeinzustand vor der Operation), sowie mögliche verlängernde Wirkung auf die Überlebenszeit, wenn andere Therapiemöglichkeiten notwendigerweise zum Wohl der Patientinnen eingesetzt werden müssen. Bei 2 Patientinnen wurde ein "second-look" und daran anschließend eine Beckenbestrahlung durchgeführt. Dies würde die relativ hohe Überlebenszeit bei der "resistenten" Patientengruppe in der vorliegenden Arbeit erklären (in der Veröffentlichung von KSST betrug sie 175 Tage).

In 2 anderen Fällen ist es strittig, ob es sich rein um einen "Tumortod" handelte. Eine Patientin (Nr. 8) war 3 Monate nach Beginn der zytostatischen Stoßtherapie sogar arbeitsfähig, verstarb 5 Monate danach an plötzlichen, massiven Pleuraergüssen. Eine andere Patientin (Nr. 9) verstarb an Beckenvenenthrombose.

In der KSST 1980 wurden diese Faktoren mit Hilfe von datenanalysierenden Verfahren in die Auswertung miteinbezogen. Die mittlere Überlebenszeit aller Patientinnen betrug 257 Tage, der Patientinnen mit resistenten Tumoren 175 Tage, mit statischen Tumoren (no change) 253 Tage und mit Remissionen 441 Tage.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob die In-vitro-"Resistenztestung" von VOLM als eine prätherapeutische Untersuchungsmethode bei Zytostatika-Behandlung geeignet ist, um Patienten vor unvermeidlichen und unerwünschten Wirkungen der Zytostatika bewahren zu können.

Unter Anwendung radioaktiv markierter Vorläufer der Nukleinsäuren ist es möglich, ihre Einbaurrate vor und nach Zusatz von Zytostatika zu messen. Dadurch kann festgestellt werden, ob die Proliferation eines Tumors durch Zytostatika gehemmt wird und somit für die Zytostatika-Behandlung "sensibel" ist, oder umgekehrt "resistent" ist. Ferner muß untersucht werden, ob das Verhalten der Tumorgewebe in-vitro mit dem klinischen Verlauf korreliert.

35 gynäkologische Karzinom-Fälle wurden untersucht - darunter in 14 Fällen postoperativ mit Zytostatika behandelte - und deren klinischer Verlauf verfolgt.

Es konnte bestätigt werden, daß die In-vitro-"Resistenztestung" als prätherapeutische Untersuchungsmethode besonders bei Ovarialkarzinomen, weniger aber bei Mamma- und Corpus(Endometrium)-Karzinomen geeignet ist.

Es konnte gezeigt werden, daß Patientinnen, deren Tumoren in-vitro von Zytostatika nicht gehemmt wurden, früher verstarben als Patientinnen, deren Tumoren auf Zytostatika ansprachen. Ein Tumor, der in der In-vitro-"Resistenztestung" als resistent nachgewiesen wird, ist prognostisch ungünstiger als ein "sensibler", wobei andere klinische Einflüsse (z.B. das Alter und der Allgemeinzustand der Patientin vor der Behandlung) immer berücksichtigt werden müssen.

DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas und die sehr hilfreiche und stets zuvorkommende Betreuung der Arbeit möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. W. Eiermann an dieser Stelle herzlich danken. Mein Dank gilt auch Frau Dr. Heyn für ihre Hilfe bei der Beurteilung der zytologischen Präparate.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. BASTERT, G., SCHMIDT-MATTHIESEN, H., GERNER, R., MICHEL, R.T., NORD, D. und LEPIEN, G.: In-vitro-Testung der Sensibilität von Mammakarzinomen gegen Zytostatika. Dtsch. med. Wschr. 100, 2035-2042 (1975).
2. BRUNNER, K.W. und NAGEL, G.A.: Internistische Krebstherapie, S.46 (1979).
3. COBB, J.P., WALKER, D.G. und WRIGHT, J.C.: Comparative chemotherapy studies on primary short-term cultures of human normal, benign and malignant tumor tissues - a 5 year study. 583-590 Cancer Res. 21, (1961)
4. COOPER, H.L.: Lymphocyte RNA labelling with ^3H -Uridine: correction of data by analysis of UTP pool saturation kinetics. In: F.Daguillard (Ed.): Proceedings of the Seventh Leucocyte Culture Conference (Academic Press: New York and London, 111, (1973).
5. DI PAOLO, J.A.: In-vitro-test systems for cancer chemotherapy. Inhibition of dehydrogenases and growth in the Ehrlich ascites tumor. Cancer Res. 23, 184-190 (1963).
6. EAGLE, H., FOLEY, G.E.: The cytotoxic activity of carcinolytic agents in tissue culture. Amer. J. Med. 21, 739-749, (1958).
7. EBELING, K. und SPITZBART: Zur Erfassung zytostatischer Effekte an Zellkulturen in vitro und deren gegenwärtige Bedeutung für eine individualisierte Tumorchemotherapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms. Zbl. Gynäk. 99, 1041 (1977).
8. FARBER, S., DIAMOND, L.K., MERCHER, R.D., SYLVESTER, R.F., WOLFF, J.A.: Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroglutamic acid (aminopterin). New England J. Med., 238, 787, (1948).
9. FOLEY, J.F. and AFTONOMOS, B.T.: Growth of human breast neoplasms in cell culture. J. Nat. Cancer Inst. 34 (1965), 217.
10. HECKMANN, U.: Neue Möglichkeiten einer Resistenztestung menschlicher Karzinomgewebe im In-vitro-Test. Dtsch. med. Wschr. 92, 932-935, (1967).
11. HELPAP, B. and MAURER, W.: Autoradiographische Untersuchung zur Frage der Vergleichbarkeit des Einbaus von markiertem Thymidin unter in-vitro-Bedingungen und bei Inkubation von Gewebeproben. Virchows Arch. Abt. B. Zellpath. 4, 102, (1969).
12. KAUFMANN, M. MATTERN, J., WAYSS, K. und VOLM, M.: Wirkung von Cyclophosphamid bei Tumoren im Sensibilitäts-Test. Arch. Gynäk. 218, 11-23 (1975).

13. KRAFFT, W., PREIBSCH, W. und MARZOTKO, F.: Erfahrungen mit dem Onkobiogramm bei gynäkologischen Karzinomen. Arch. Geschwulstforsch. 41, 241-247 (1973).
14. KRAFFT, W., PREIBSCH, W., MARZOTKO, F. und NIEDNER, K.: Zur Erfassung zytostatischer Effekte in-vitro mit Hilfe eines objektiven Zellzählungsverfahrens, Arch. Geschwulstforsch. 44, 140, (1974).
15. KUMMER, D., MILDOENBERG, H.: Die Bedeutung des sogen. Onkobiogramms für die Therapie maligner Tumoren des Kindes. Wschr. d. Kinderheilkunde 123, 390, (1975).
16. KUPIECKI, F.P.: Cell culture studies with unique cytotoxic steroids. Cancer Res. 25, 417-420, (1965).
17. LENNARTZ, K.J., KLEIN, H.O., FEAUX DE LACROIX, W. und KLEIN, P.J.: Vergleichende in-vitro und in-vitro-Untersuchungen der Zellkinetik experimenteller Tumoren und die Bestimmung des Generationszyklus von Tumorzellen des Menschen in vitro. Verh. Dtsch. Ges. Path. 55, 591, (1971).
18. LIMBURG, H. und KRAHE, M.: Die Züchtung von menschlichem Krebsgewebe in der Gewebekultur und seine SENSibilitäts-testung gegen neuere Zytostatika. Dtsch. med. Wschr. 89, 1938-1940, (1964).
19. LIMBURG, H. und HECKMANN, U.: Die Chemotherapieresistenz bei der Behandlung von Ovarialkarzinomen. In: Fortschritte der Krebsforschung, Schmidt, G.G. und Wetter, O. (Hrsg.), 301-310. Stuttgart (1969).
20. MATTERN, J. KAUFMANN, M., VOLM, M. und Mitarb.: Zur Sensibilitätstestung maligner menschlicher Tumoren gegenüber Cytostatika II. Klin. Wschr. 50, 196-198, (1972).
21. MATTERN, J. KAUFMANN, M., WAYSS, K., VOLM, M., KLECKOW, M., MOSTAGHI, M. and VOGT-MOYKOPF, I.: Clinical correlates of in vitro effect of adriamycin on advanced lung carcinoma. Klin. Wschr. 54, 665, (1976).
22. MICHEL, Th. und Mitarb.: Nu-Nu Mäuse als Modell. 42. Tagung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Hamburg 9, 80.
23. NISSEN, E., TANNEBERGER, S., PROJAN, A., MORACK, G. and PEEK, U.: Recent results of in vitro drug prediction in human tumor chemotherapy. Arch. Geschwulstforsch. 48, 667, (1978).
24. PATERSON, E., HADDOW, A., THOMAS, I.A., WATKINSON, J.M.: Leukemia treated with urethan compared with deep x-ray therapy. Lancet I, 667 (1946).
25. PFLEIDERER, A., KIYAN, S.: Die Behandlung des Ovarialkarzinoms in der Univ.-Frauenklinik Tübingen seit 1957 und ihre Ergebnisse. Med. Welt 18, 3095 (1967).

26. POSSINGER, K., HARTENSTEIN, R. und EHRHART, H.: Resistenztestung von menschlichen Tumoren gegenüber Cytostatika. Klin. Wschr. 54, 349-355, (1976).
27. RAJEWSKY, M.F.: In-vitro studies of cell proliferation in tumors. II. Characteristics of standardized in vitro system for the measurement of ^3H -Thymidin incorporation into tissue explants. Europ. J. Cancer 1 (1965), 281.
28. RAJEWSKY, M.F.: Zellproliferation in normalen und malignen Geweben: ^3H -Thymidin-Einbau in vitro unter Standardbedingungen. Biophysik 3, 65, (1966).
29. SEEBER, S. und SCHMIDT, C.G.: Zum Problem der prätherapeutischen Sensibilitätsbestimmung von Tumoren durch Inkorporationsstudien in vitro. Klin. Wschr. 55, 1127-1136, (1977).
30. SENN, H.J.: Zur Therapie des fortgeschrittenen inoperablen Ovarialkarzinoms. Ther. Umsch. 30, 651, (1973).
31. SMITH, J., RUTLEDGE, F., WHARTON, T.: Chemotherapy of ovarian cancer. Cancer 30, 1565, (1972).
32. TANNEBERGER, St.: Gewebekultur und Krebschemotherapie. Archiv f. Geschwulstforschung 31,
33. TOPLIN, J.: Experiences with the tissue culture system in large-scale cancer chemotherapy screening. Cancer Res. 21, 1042-Lo46, (1961).
34. VAN PUTTEN, L.M., LELIEVELD, P. and KRAM-IDSENGA, L.K.J.: Cell-cycle specificity and therapeutic effectiveness of cytostatic agents. Cancer Chemother. Rep. 56, 691, (1972).
35. VOLM, M., KAUFMANN, K., HINDERER, H. und GOERTTLER, K.: Schnellmethode zur Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegenüber Cytostatika. Klin. Wschr. 6, 374-376, (1970).
36. VOLM, M., KAUFMANN, M., WAYSS, K. und MATTERN, J.: Resistenztestung von menschlichen Tumoren im Kurzzeit-Test. Klin. Wschr. 53, 579-580, (1975).
37. VOLM, M., KAUFMANN, M., MATTERN, J. und WAYSS, K.: Möglichkeiten und Grenzen der prätherapeutischen Sensibilitätstestung von Tumoren gegen Zytostatika im Kurzzeit-Test. Schweiz. med. Wschr. 105, 74, (1975).
38. VOLM, M., WAYSS, K., KAUFMANN, M. and MATTERN, J.: Pretherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy. Europ. J. Cancer 15, 983, (1979).
39. WHEELER, T.K., DENDY, P.P. and DAWSON, A.: Assessment of an in vitro screening test of cytotoxic agents in the treatment of advanced malignant disease. Oncology 30, 362, (1974).
40. WILMS, K.: DNS-Synthese in menschlichen Blutzellen. Biochemische Untersuchungen zur Therapie akuter Leukosen mit zytotoxischen Substanzen. Thieme Verlag, Stgt., 5-20, (1975).

41. WINTROBE, M.M., HUGULEY jr., C.M.: Nitrogen mustard therapy for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, the leukemias and other disorders. Cancer 1, 357, (1948).
42. WÜST, G.P.: Sensibilitätstestung maligner Tumoren gegen Zytostatika in vitro und in vivo Methoden und klinische Erfahrungen. Münch. med. Wschr. 115, 839-842, (1973).
43. YOUNG, R.: Chemotherapy of ovarian cancer: past and present. Sem. Oncol. 2, 267, (1975).
44. SCHELLENBERG, H. and DOMENJOZ, R.: Med. exper. 7, 137, (1962)
45. STÄHELIN, H.: Med. exper. 7, 92, (1962)

Lebenslauf

05. September 1953	in Surabaya/Indonesien geboren
Vater	Dr.med. Moeljono Djojopranto
Mutter	Oetari Soemitro geb. Amin (verw. Oetari Moeljono)
1960-1966	Grundschule an der katholischen Schule
1966-1969	Sancta Maria, Surabaya Mittelschule, ebenfalls St. Maria Surabaya
1969-1972	Gymnasium, Jakarta
1972	Abitur, am Gymnasium St. Theresia, Jakarta
WS 73/74 - WS 79/80	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
06. Mai 1980	Staatsexamen
09.02. - 31.07.1981	Assistenzärztin an der LVA-Klinik für Erkrankungen der Verdauungsorgane in Bad Kissingen
20.07.81 - 31.05.82	Assistenzärztin an der Klinik St. Irmingard (Abschlußheilverfahren kardiologische Krankheiten mit psychosomatischen Aufgabenstellungen)
01.06.82 - 07.01.83	Stipendiatenstelle am Max-Planck- Institut für Psychiatrie, Abt. Erwachsenenpsychiatrie
13.12.1982	Approbation (nach Einbürgerung 11.08.82)
Seit 10.01.1983	an der psychosomatischen Klinik Windach als Stationsärztin tätig.

